

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①2 **Offenlegungsschrift**
①1 **DE 3639561 A1**

②1 Aktenzeichen: P 36 39 561.7
②2 Anmeldetag: 20. 11. 86
④3 Offenlegungstag: 1. 6. 88

Behörden Eigentum

⑤1 Int. Cl. 4:
C07K 17/02

C 07 K 9/00
C 07 K 17/08
B 01 D 13/04
C 07 K 17/10
A 61 L 33/00
A 61 L 27/00
// C07K 17/10, 17/12,
C08L 5/00, 89/00,
C12M 1/00, 3/00,
C08B 37/00

DE 3639561 A1

⑦1 Anmelder:
Baumann, Hanno, Prof. Dr.; Keller jun., Ruprecht, Dr.
Dr., 5100 Aachen, DE

⑦4 Vertreter:
Umlauf, E., Dipl.-Chem. Dr., Pat.-Anw., 8000
München

⑦2 Erfinder:
gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verfahren zur Herstellung von nicht-thrombogenen Substraten

DE 3639561 A1

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von nicht-thromboge-
nen Substanzen, für die Herstellung von Membran-
en, Organersatzteilen, Kanülen, Spritzen, Schläu-
chen, Röhren, Blutbehältern und ähnlichen, für den
Einsatz in der Medizin angewandten Blutbehältnis-
sen durch Verankerung von HS I an Polymere und/
oder auf Oberflächen von allen bis heute bekannten
Biopolymeren und synthetischen Polymeren, ein-
schließlich deren bis heute bekannten Copolymeren
und deren Derivate und reaktiven Derivate, wie
zuvor beschrieben. HS I ist **dadurch gekennzeichnet**,
daß es sich um ein spezifisches Endothelzellober-
flächen-Proteopolysaccharid handelt, welches
nur von diesen Zellen produziert wird. Es trägt drei
bis vier Polysaccharidseitenketten, die ein Moleku-
largewicht von je 35 000 aufweisen und ein zentra-
les Coreprotein mit einem Molekulargewicht von
etwa 55 000. Der Polysaccharidanteil dieser Sub-
stanz unterscheidet sich von allen bisher bekannten
Strukturpolysacchariden und Glykosaminoglykanen,
speziell von allen bekannten Heparinen und
Heparansulfaten dadurch, daß er keinerlei Wechsel-
wirkungen mit den Faktoren der Blutgerinnung
und keinerlei sonstige biologische Aktivität auf-
weist, die bisher bei Glykosaminoglykanen und
speziell Heparinen und Heparansulfaten beobach-
tet wurde, weitere Details siehe oben.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß etwa 0,01 – 100 µg HS I pro Quadrat-
zentimeter Polymeroberfläche kovalent gebunden
werden und zwischen 1 und 80 kovalenten Veran-
kerungsstellen oder Querbrücken zwischen HS I
und Polymer vorliegen.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die Verankerung von HS I in oder auf
dem polymeren Substrat durch Salzbrücken, hy-
drophobe Interaktionen, Wasserstoffbrückenbin-
dung und van der Waals Kräfte, Adsorption, Mi-
kroverkapselung oder Netzwerkeinschluß in einer
Konzentration von 1 µg – 1000 µg pro Quadrat-
zentimeter stattfindet.
4. Verfahren nach Anspruch 1–3, dadurch gekenn-
zeichnet, daß HS I an Polymersubstrate verankert
wird unter Ausnutzung der Proteinleisten von HS I.
Bei in-vivo Applikation von Spezies-differentem
Material muß die Länge und Struktur der Protein-
leiste des HS I so geschaffen sein, daß keine im-
munologischen oder sonstigen Unverträglichkeits-
reaktionen auftreten können.
5. Verfahren nach Anspruch 1–3, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die HS I Polysaccharidkette an das
polymere Substrat kovalent gebunden wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 4 und 5, dadurch
gekennzeichnet, daß alle bekannten Verbrückungs-
reagenzien oder Quervernetzungsmethoden zur
Herstellung kovalenter Bindungen zur Veranke-
rung von HS I an Polymeroberflächen eingesetzt
werden können, die zur Verankerung von Farbstoffen
an Polymere oder Proteinen an Polymere oder
Proteinen und Kohlenhydrate an Polymere oder
Biopolymere untereinander eingesetzt werden,
weitere Details siehe oben.
7. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 4–6, dadurch ge-
kennzeichnet, daß HS I und/oder das polymere
Substrat mit den bekannten proteinchemischen
Methoden und den Methoden der Enzymimmobili-

- sierung sowie den Methoden der Polysaccharidche-
mie und der Polymerchemie aktiviert und anschlie-
ßend HS I mit dem Polymersubstrat kovalent ver-
bunden wird.
8. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 4–7, dadurch ge-
kennzeichnet, daß die kovalente Verbrückung von
HS I an polymere Substrate entweder mit der
Querbrückenlänge "0" (Selbstquervernetzung oder
Vernetzung nur unter Beteiligung der funktionellen
Gruppen des polymeren Substrates und des HS I)
oder mit der Querbrückenlänge größer als 0 unter
Verwendung von hydrophilen oder hydrophoben,
amphiphilen, geladenen oder ungeladenen Spacern
in einer Größenordnung 0,2–5 nm erfolgt.
 9. Verfahren nach Anspruch 1, 3–5, dadurch ge-
kennzeichnet, daß die salzartige Bindung von HS I
an das polymere Substrat entweder direkt über die
geladenen funktionellen Gruppen erfolgt, oder unter
Zuhilfenahme von zwischen HS I und polymere
Substrat gelegenen, geladenen Substanzen, wie
z. B. zwitterionische Substanzen und Polymere,
Proteine etc., in einer Größenordnung
0,15–200 nm.
 10. Verfahren nach Anspruch 1, 3–5 und 9, dadurch
gekennzeichnet, daß die geladene Gruppe entwe-
der direkt am backbone des polymeren Substrates
oder des HS I oder unter Verlängerung des Ab-
standes zwischen geladener Gruppe und polymere
Substrat bzw. HS I durch Verlängerung der
Seitenketten des Polymeren in einer Größenord-
nung von 0,15–500 nm gebunden ist.
 11. Verfahren nach Anspruch 1, 3–5, dadurch ge-
kennzeichnet, daß das HS I zunächst an positiv ge-
ladene Gruppen bindet, die Bestandteil von Sub-
stanzen mit hydrophoben Resten sind, über die eine
hydrophobe Bindung an das polymere Substrat zu-
stande kommt.
 12. Verfahren nach Anspruch 1–5, dadurch ge-
kennzeichnet, daß HS I an polymere Substrate ad-
sorbiert wird über salzartige Bindung, Wasserstoff-
brückenbindung, hydrophobe Interaktionen und
van der Waals Kräfte, und danach die Quervernet-
zung mit Reagenzien und Methoden nach An-
spruch 6 und 8 erfolgt.
 13. Verfahren nach Anspruch 1 und 3, dadurch ge-
kennzeichnet, daß HS I immobilisiert wird durch
Vorpolymerisierung des zu erstellenden Polymer-
substrates, welches noch löslich ist; anschließend
wird HS I mit oder ohne Vernetzungsmittel zuge-
geben und zu Ende polymerisiert zu einem unlösli-
chen Polymersubstrat.
 14. Verfahren nach Anspruch 1 und 3, dadurch ge-
kennzeichnet, daß das HS I im Polymersubstrat mi-
kroverkapselt wird nach der Methode der Grenz-
schichtenpolymerisation, der Flüssigkeitentrock-
nungsmethode, der Koadsorbierungsmethode, der
Phasenmethode und der Liposomentechnik.
 15. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch ge-
kennzeichnet, daß HS I mit reaktionsfähigen Sei-
tenketten von Vinylmonomeren umgesetzt wird;
anschließend wird nach den üblichen Methoden mit
anderen Monomeren copolymerisiert.

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur
Herstellung von hämokompatiblen Substraten durch
Einarbeitung, Adhäsion und/oder Modifizierung und

Verankerung von nichtthrombogenem Endothelzelloberflächen-Polysaccharid (HS I) in seiner Peptid-gebundenen oder freien Form in und/oder auf synthetische und Bio-Polymere (Substrate) mittels physikalischer Verteilung, Adhäsion an der Oberfläche und/oder chemischer Verankerung, die als blutverträgliche Substrate in der Medizin eingesetzt werden können. Diese Polymere können in Form von Fasern, Hohlfasern, Membranen, Organersatzteilen, Kanülen, Spritzen, Schläuchen, Blutbehältern oder in anderer Form vorliegen oder dazu verarbeitet werden.

Es ist bekannt, daß unphysiologische Polymere ohne zusätzliche Hilfsmaßnahmen bei Blutkontakt mehr oder weniger rasch zur Blutgerinnung führen. Weiterhin ist bekannt, daß die Strömungsverhältnisse des Blutes, die u. a. beeinflußt werden durch die Gestalt, Oberflächenbeschaffenheit und elastischen Eigenschaften von Substraten, den Gerinnungsprozeß des Blutes ebenfalls stark beeinflussen. Wenn jedoch geeignete Polymere wie z. B. EP-Copolymere, Cellulose, fluoriertes Polyethylen, Polyetherurethan, Polyethercarbonat, Hydrogele von z. B. Polyacrylamid ausgewählt werden, nimmt die Blutgerinnung nach Polymerkontakt deutlich ab.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Blutgerinnung weiter herabzusetzen durch Überziehen von hydrophoben Polymeren mit Albumin. Eine weitere Möglichkeit zur Herabsetzung der Koagulation des Blutes ist der Einsatz von sulfonierten und sulfatierten Produkten wie z. B. sulfatiertes Polystyrol oder Vinylsulfonsäurehaltige Copolymere.

Die größten Blutgerinnungshemmenden Effekte wurden erzielt durch Einbau oder Oberflächen-Modifizierung von Polymeren, mit blutgerinnungshemmenden Mitteln, wie Heparin oder Heparinoide. Schon der Einschluß von Heparin in mikroporöses Kunststoffmaterial, aus dem es leicht herausdiffundieren kann, führt zu einer antikoagulierenden Wirkung. Deutlichere Effekte wurden erzielt durch oberflächliche Modifizierung von z. B. Styrol mit anschließender salzartiger Bindung von Heparin.

Durch die bisher produzierten Materialien ist es aber noch nicht gelungen, eine Blutverträglichkeit zu erreichen, wie sie z. B. die intakte Endothelzelloberfläche auf der luminalen Seite des Blutgefäßes bewirkt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von hämokompatiblen, polymeren Substraten.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Einlagerung, Adsorption oder Bindung eines biologisch und speziell gerinnungsphysiologisch inerten Endothelzelloberflächen-Polysaccharid in seiner freien oder peptidgebundenen Form an oder in geeignete Polymere. Diese Einlagerung, Adsorption oder Bindung kann über van der Waals Wechselwirkungen, Salzbrücken, Chelatbindungen oder durch kovalente Bindung erreicht werden. Die Blutverträglichkeit der so gewonnenen modifizierten Polymeren ist gegenüber allen bisher bekannten Polymeren deutlich verbessert.

Die so modifizierten Polymere sollen Einsatz finden in Form von künstlichen Organen, Membranen, Hohlfasern, Oxigenatoren, Spritzen, Schläuchen, Behältern, faserhaltigen Gebilden, die dadurch gekennzeichnet sind, daß

1. HS I eingearbeitet oder immobilisiert oder auf der Oberfläche verankert wird in synthetische und Biopolymere nach den bekannten Methoden der

Immobilisierung von Enzymen, Membranherstellung, der Kunststoffverarbeitung und den Methoden der Polymerchemie über van der Waals Kräfte, hydrophobe Interaktionen, Chelatbindungen und salzartige Bindungen.

2. HS I kovalent verankert wird an synthetischen Polymeren und Biopolymeren nach den Methoden der Peptidchemie, Proteinchemie, Zuckerchemie oder Polymerchemie.

Unter dem Begriff HS I wird ein Endothelzelloberflächen-Proteo-Polysaccharid mit einem Molekulargewicht von etwa 195 000 und einem Molekulargewicht des Polysaccharidteils von 35 000 bei 3—4 Polysaccharidketten/Molekül, und einem Peptidanteil von 55 000 verstanden. Der Polysaccharidanteil, eine Untereinheit des Moleküls, die über Proteolyse oder Alkaliabbau zugänglich ist, hat sich in allen biologischen Aggregations- und Funktionstesten als völlig inert erwiesen, z. B. in bezug auf

- Wechselwirkung mit den Faktoren der Blutgerinnung,
- Wechselwirkung mit Antithrombin III,
- Wechselwirkung mit Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren wie z. B. Platelet derived growth factor etc.,
- Wechselwirkung mit Bindegewebsstrukturpolymeren wie Kollagen I—VI, Laminin, Fibronectin, Nidogen und Entactin,
- Wechselwirkung mit Thrombozyten.

Diese Substanz kann als Polysaccharidanteil mit oder ohne verbleibendem Peptidrest für die Bindung an Polymere zur Herstellung hämokompatibler Substrate eingesetzt werden. Die Langzeit-Blutverträglichkeit von Peptid-gebundenem HS I-Polysaccharid kann durch Bindung von Plasmaproteinen an den verbleibenden Peptidrest oder Immunisierung bei Verwendung von HS I aus anderen Spezies eingeschränkt sein. In einem solchen Fall wird der Peptidrest durch weitere Proteolyse verkürzt oder, falls erforderlich, durch Einwirkung von 0,5 M NaOH restlos entfernt.

HS I wird aus dem konditionierten Medium von massenkultivierten Endothelzellen oder aus den Endothelzellen selbst nach Molekulargewicht, Hydrophobizität und Ladung gereinigt:

Bovine aortale Endothelzellen, oder Endothelzellen aus anderen Spezies und anderen Blutgefäßen, bzw. Endothelzellen aus anderen Geweben wie z. B. Cornea, Liquorhöhlen etc. werden durch Behandlung mit Kollagenase, durch mechanische Ablösung, durch Behandlung mit anderen lytischen Reagenzien wie z. B. Heparinase und/oder Heparitinase, durch Behandlung mit Trypsin oder anderen Proteasen, durch Einwirkung von EDTA, EGTA oder anderen Chelatbildnern aus dem Gewebe gelöst und in herkömmlichen Gewebekulturfラスchen, in Petrischalen, in Hollow-Fiber-Perfusionskulturen, auf Beads, in Rollerflaschen oder in anderer Weise in großer Anzahl gezüchtet (2×10^9 Zellen/Präparation). Die Aufzucht erfolgt nach den herkömmlichen Techniken der Gewebe und Zellkultur.

Die Zellen werden, wie oben beschrieben, von der Unterlage gelöst, durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen, durch Ultraschallbehandlung, durch Behandlung in einem Potter oder durch andere Weise homogenisiert, bei $10\,000 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand mit Detergenzien, vorzugsweise 2% SDS, gelöst.

Als eine weitere Quelle für HS I kann das konditionierte Medium von Endothelzellen dienen. Hierzu wird das Medium zunächst mit Chondroitinase ABC inkubiert, in Gegenwart von Chelatbildnern wie z. B. EDTA, am Rotationsverdampfer, eingengt und dann prinzipiell in der gleichen Weise aufgearbeitet, wie für das Material zellulären Ursprungs beschrieben.

Die HS I-haltigen Materialien werden an Sepharose CL-6B oder Sepharose CL-4B chromatographiert. Als Säulendimensionen werden Durchmesser zu Höhen-Verhältnissen von 1:10 – 1:50 verwendet (z. B. 10 x 200 cm). Als Elutionsmittel kann 0,13 M Tris/HCl, 0,1% SDS pH 7,4 oder ein anderes geeignetes Laufmittel Verwendung finden. Der Nachweis des HS I in dem Präparationsschritt kann erfolgen durch Reaktion von Aliquots aus den Chromatographiefraktionen in Nachweisreaktionen für Zucker, wie z. B. die Orcinreaktion, in Nachweisreaktionen für Uronsäuren, wie z. B. die Carbazolreaktion, durch Zugabe einer geringen Menge radioaktiv markierten HS I vor der Sepharose-Chromatographie oder auf andere Weise.

Die so identifizierten HS I-haltigen Chromatographiefraktionen werden 1:10 am Rotationsverdampfer eingengt, entsalzt durch Chromatographie an Sephadex, G-25, oder durch Dialyse, durch Ultrafiltration an Ultrafiltrationsmembranen, durch Ausfällen in 80% Ethanol oder auf andere Weise und danach in 3–7 M Harnstoff, Detergenzien wie z. B. 0,1% Triton X-100 und Puffersalzen, wie z. B. 0,1 M NaAc pH 6,5 aufgenommen. Die Lösung wird auf eine Anionenaustauschersäule, wie z. B. DEAE-Cellulose in Gegenwart von 7 M Harnstoff, Detergenzien und Puffersalzen aufgetragen und mit einem Salz-Gradienten (z. B. 0–1 M NaCl) wieder von der Säule eluiert.

Als weitere Reinigungsschritte stehen die folgenden Techniken zur Verfügung:

- Dichtegradienten-Ultrazentrifugation in einem CsCl-Gradienten bei einer mittleren Dichte von vorzugsweise 1,4 g/ml.
- Weitere Zyklen von Gelchromatographie/Ionenaustauscherchromatographie.
- Chromatographie an lipophilen Gelen wie z. B. Octylsepharose,
- HPLC an Ionenaustauschersäulen, Silicagelsäulen, reversed-Phase-Säulen und an Gelsäulen.

Die folgenden Kriterien werden zur Prüfung der Homogenität einer HS I Präparation herangezogen:

1. die Nicht-Nachweisbarkeit Galaktosamin in der Bausteinanalyse zeigt die Freiheit von kontaminierendem Chondroitinsulfat an,
2. ein Absorptionsmaximum bei 280 nm und ein Minimum bei 260 nm zeigt die Freiheit von kontaminierender RNS oder DNS an,
3. eine Bande in der NU-Sieve-Agarose Gelelektrophorese und eine Bande (bei 55 000 in der SDS-Gelelektrophorese zeigt die Abwesenheit von kontaminierenden Proteinen an.
4. nach Inkubation in 0,5 M NaOH für 12 h bei 4°C wird ein hochmolekulares Polysaccharid gefunden.

Als Modifikation der Präparation kann auch das HS I Polysaccharid bzw. Peptidopolysaccharid durch Alkalidegradation (z. B. Inkubation in 0,5 M NaOH für 12 h bei 4°C) oder proteolytischen Abbau (z. B. mit Papain oder mit Pronase) oder andere Verfahren in jeder Stufe

der Präparation, auch aus den unbehandelten Zellen oder aus dem unbehandelten Medium freigesetzt und über Gelchromatographie, enzymatischen Abbau von kontaminierenden Biopolymeren, Ionenaustauscherchromatographie, Dichtegradientenultrazentrifugation, HPLC an Gelpermeationssäulen, an Silicagelen und/oder an reversed phase Säulen gereinigt werden. Mit Ausnahme des oben angeführten Punkt 3 finden alle oben dargestellten Homogenitätskriterien für eine solche Präparation Verwendung.

Unter dem Begriff "synthetische Polymere und Biopolymere" sollen alle bekannten natürlichen Polymere und bisher synthetisch hergestellten Polymere verstanden werden, die als Homo- und verschiedene Copolymere mit unterschiedlicher Taktizität, unterschiedlichem Molgewicht, unterschiedlicher Sequenzanordnung der Bausteine u. a. statistischer und/oder alternierender Reihenfolge; Blockcopolymere mit unterschiedlichen Sequenzlängenverteilungen, Triblockcopolymere, Ionomere, Pfropfcopolymere, Polymere mit unterschiedlichem Vernetzungsgrad, sowie Polymere, die durch polymeranaloge Reaktionen modifiziert werden, verstanden werden. Die erfindungsgemäß im folgenden aufgeführten Polymere sind nur eine kleine Auswahl von Polymeren, die durch weitere Copolymerisationen, Pfropfung oder polymeranaloge Reaktionen zusätzlich modifiziert werden können und damit die erweiterte Auswahl von geeigneten synthetischen und Biopolymeren ergeben. Beispiele der kleineren Auswahl von geeigneten synthetischen und Biopolymeren:

Polyolefine, Polyethylen (HDPE, LDPE, LLPE), fluoriertes Etylen Copolymere des Ethylens mit Buten-(1), Penten-(1), Hexen-(1), Copolymere des Ethylens und Propylens, EPR-Kautschuk, oder EPT-Kautschuk (dritte Komponente mit Dienstruktur u. a. Dicyclopentadien, Ethylidennorbornen, Methylendomethylenhexahydronaphthalin, cis-cis-Cyclooctadien-1,5, Hexadien-1,4, Hexyn (1-Hexen-methylhexadien).

Ethylen-Vinylacetat-Copolymer, Ethylen-Methacrylsäure-Copolymer, Ethylen-N-Vinylcarbazol, Ethylen-Trifluorchlorethylen, Polypropylen, Polybuten (1), Poly-4-(Methylpenten (1), Polyisobutylen-Copolymer, Isobutylen-Styrol-Copolymer, Butylkautschuk, Polystyrol und modifiziertes Styrol, Chlormethyliertes Styrol, sulfoniertes Styrol, Poly-(4-Aminostyrol), Styrol-Acrylnitril-Copolymer, Styrol-Acrylnitril-Butadien-Copolymer, Acrylnitril-Styrol-Acrylester-Copolymer, Styrol-Butadien-Copolymer, Styrol-Divinylbenzol-Copolymer, Polydiene in der cis-trans, in der 1–2 und in der, 3–4 Konfiguration, Butadien, Isopren, gereinigter Naturkautschuk, Chloropore, Styrol Butadien-Copolymer (SBR), Triblockpolymere, (SBS), NBR Acrylnitril-Butadien-Copolymer, Poly-(2,3-dimethylbutadien), ein Triblock-copolymer aus Polybutadien terminiert mit, cycloaliphatischen sekundären Aminen, oder -benzyl-L-glutamat oder Polypeptiden oder, N-Carbobenzoxylisin, Poly-(alkenamere)-Polypentenamer, Poly-(1-hexen-methyl-hexadien), Poly-Phenylene, Poly (p-xylylen), Polyvinylacetat, Vinylacetat-vinylstearat-Copolymer, Vinylacetat-vinylpivalat-Copolymer, Vinylacetat-Vinylchlorid-Copolymer, Polyvinylalkohol, Polyvinylformal, Polyvinylbutyral, Polyvinylether, Poly-(N-vinylcarbazol), Poly-N-vinylpyrrolidon, Poly-(4-vinylpyridin), Poly-(2-vinylpyridiniumoxid), Poly-(2-methyl-5-vinylpyridin), Butadien-(2-methyl-5-vinylpyridin)-Copolymer, Polytetrafluorethylen, Tetrafluorethylen-hexafluorpropylen-Copolymer, Tetrafluorethylen-Perfluorpropylvinylether-Copolymer, Tetrafluorethylen-ethylen-Copolymer,

Tetrafluorethylen-trifluornitrosomethan-Copolymer, Tetrafluorethylen-perfluormethylvinylether-Copolymer, Tetrafluorethylen-(Perfluor-4-Cyanobutylvinylether)-Copolymer, Poly-(trifluorchlormethylen), Trifluorchlorethylen-ethylen-Copolymer, Polyvinylidenfluorid, Hexafluorisobutylene-vinylidenfluorid-Copolymer, Polyvinylfluorid, Polyvinylchlorid, schlagfestes PVC durch Beimischen von ABS, MBS, NBR, chloriertem PE, EVAC oder Polyacrylaten, Weich-PVC, nachchloriertes PVC, Vinylchlorid-vinylacetat-Copolymer, Vinylchloridpropylen-Copolymer, Polyvinylidenchlorid-Vinylchlorid-vinylidenchlorid-Copolymer, Vinylidenchlorid-acrylnitril-Copolymer, Polyacrylsäure, Acrylsäure-itakonsäure-Copolymer, Acrylsäure-methacrylsäure-Copolymer, Acrylsäureester-acrylnitril-Copolymer, Acrylsäureester-2-chlorethylvinylether-Copolymer, Poly-(1,1-dihydroperfluorbutylacrylat), Poly-(3-perfluormethoxy-1,1-dihydroperfluorpropylacrylat), Polysulfon, Polyacrolein, Polyacrylamid, Acrylsäure-acrylamid-Copolymer, Acrylamid-maleinsäure-Copolymer, Acrylamid-hydroxymethylmethacrylat-Copolymer, Acrylamid-methylmethacrylat-Copolymer, Acrylamid-methylacrylat-Copolymer, Acrylamid-maleinsäureanhydrid-Copolymer, Acrylamid-methacrylsäureanhydrid-Copolymer, Acrylamid-anilinoacrylamid-Copolymer, Acrylamid-(N-acryloyl-4-carboxymethyl-2,2'-dimethylthiazoline)-Copolymer, Polymethacrylamid, Methacrylsäure-methacrylnitril-Copolymer, Methacrylsäure-3-fluorstyrol-Copolymer, Methacrylsäure-4-fluorstyrol-Copolymer, Methacrylsäure-3-fluoranilid-Copolymer, nitrierte Copolymere von Methacrylsäure mit, Methacrylsäure-3-fluoroanilid oder Fluorstyrol, oder Copolymere von Methacrylsäure mit 3-4-Isothiocyantostyrol, oder N-Vinylpyrrolidon mit Maleinsäureanhydrid, oder Polyvinylalkohol und Polyallylalkohol, Polyacrylnitril, Acrylnitril-2-vinylpyridin-Copolymer, Acrylnitril-methylsulfonat-Copolymer, Acrylnitril-N-vinylpyrrolidon-Copolymer, Hydroxylgruppenhaltiges PAN, Acrylnitril-vinylacetat-Copolymer, Acrylnitril-acrylester-Copolymer, Polyallylverbindungen, Polydiallylphthalat, Polytrisallylcyanurat, Poly- α -cyanoacrylate, Polydimethylaminoethylmethacrylat und Copolymere mit Acrylnitril, Methylmethacrylat-laurylmethacrylat-Copolymer, P-Acetaminophenylethoxymethacrylat-methylmethacrylat-Copolymer, Glycoldimethacrylat-methacrylat-Copolymer, Poly-2-hydroxyethylmethacrylat, 2-Hydroxyethylmethacrylat-methylmethacrylat-Copolymer, Glycoldimethacrylat-glycoldimethylmethacrylat-Copolymer, HEMA-Styrol-Block und Pfropfcopolymer, Poly-NN'-PP'-oxydiphenylmellitimid, Polydiethylenglykolbisallylcarbonat, aliphatische Polyether, Polyoxymethylene, Polyoxyethylen, Polyfluoral, Polychloral, Polyethylenoxid, Polytetrahydrofuran, Polypropylenoxid, Ethylenoxidpropylenoxid-Copolymer, Propylenoxid-allylglycidylether-Copolymer, Polyepichlorhydrin, Ethylenoxid epichlorhydrin-Copolymer, Poly-1,2-dichlormethyl-ethylenoxid, Poly-2,2-bis-chlormethyl-oxacylobutan, Epoxid-Harze, Bis-phenol-A-diglycidylether, epoxidiertes Phenol-Formaldehyd, Kresol-Formaldehyd, Harze, Vernetzung mit Carbonsäureanhydriden, Aminen wie Diethylenetriamin, Isophorondiamid, 4,4'-Diaminodiphenylmethan, aromatische Polyether, Polyphenylenoxide, Polyphenol, Phenoxharze, Aliphatische Polyester, Polylactid, Polyglycolid, Poly- β -propionsäure, Poly- β -D-hydroxybutyrat, Polypivalacton, Poly- ϵ -caprolacton, Polyethylenglycoladipat, Polyethylenglycolsebazat, Ungesättigte Polyester aus Maleinsäureanhydrid, Phthalsäureanhydrid, Isophthalsäure, Terephthalsäure oder HET-Säure mit, Et-

hylenglycol, 1,2-Propylenglycol, Neopentylglycol, oxethylierte Bisphenole oder Cyclododecandiol, Vernetzung ungesättigter Polyester-Harze oder Vinylesterharze durch, Copolymerisation von ungesättigten Polyestern mit Styrol, Methacrylat, Vinylmonomere, Vinylacetat, Methylmethacrylat, Polycarbonat aus Bisphenol A sowie dessen Derivate und Polyether, Polyester, segmentierte Polycarbonate aus Bisphenol A sowie dessen Derivate, und aliphatischen Polyethern sowie, aliphatischen Polyestern (siehe oben), Polyethylenglykolteterephthalat (PET) oberflächenmodifiziert, mit Acrylsäure gepfropft oder durch partielle Hydrolyse, der Oberfläche von PET, Polybutylenglykolteterephthalat, Polyethylenglykolteterephthalat, Polyethylenglykolteterephthalat, segmentiert mit Polyetherblöcken und aliphatischen Polyesterblöcken und Polytetrahydrofuranblöcken, Poly-p-hydroxybenzoat, Hydroxybenzoesäure-Isophthalsäure-Copolymer, Hydroxybenzoesäure-hydrochinon-Copolymer, Hydroxybenzoesäure-terephthalsäure-Copolymer, Hydroxybenzoesäure-pp'-Diphenylether-Copolymer, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylpyrrolidone-maleinsäureanhydrid-Copolymer, Alkydharze aus Glycerin, Trimethylpropan, Pentaerythrit, Sorbit mit Phthalsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Adipinsäure und Fettsäure aus Leinöl, Ricinusöl, Sojaöl, Kokosöl, aliphatische Polysulfide -(R-Sx-) x = Schwefelgrad, aromatische Polysulfide, Polythio-1,4-phenylen, aromatische Polysulfidether aus Phenol und Thiophen, Polyethersulfone, Polysulfo-1,4-phenylen, Poly-p-phenylensulfon, Polyimine, Polyethylenimin, verzweigte Polyethylenimin, Polyalkylenimine, Polyamide, Polyhexamethylenadipamid, Polyhexamethylensebacamid, Polyhexamethylen-dodekandiamid, Polytridecanbrassylamid, Versamide aus pflanzlichen Ölen mit Diamen und Triaminen, Polyamid aus ω -Aminocarbonsäuren mit α , β , γ , δ -Aminocarbonsäuren oder Lactamen, Terephthalsäure-m-aminobenzamid-Copolymer, Terephthalsäure-m-phenylendiamin-Copolymer, Polyamidhydrazide, z. B. aus Isophthalsäure und m-Aminobenzhydrazid, Polypiperazinamide z. B. aus Fumarsäure und Dimethylpiperazin, Polybenzimidazole aus Terephthalsäure und Tetraaminobenzol (substituiert), oder aus Diaminodiphenylether und Dichlordiphenylsulfon (substituiert und, cyclisiert) oder aus m-Phenylenisophthalamid und Terephthalamid, Polyimide z. B. aus Pyromellitsäure-dianhydrid, Methoxy-m-phenylendiamin, Pyrrolone z. B. aus Pyromellitsäuremedianhydrid und Diaminobenzidin, aromatische Polyamide, Poly-m-phenylenisophthalamid, Poly-p-benzamid, Poly-p-phenylenteterephthalamid, m-Aminobenzoesäure-p-phenylendiamin-isophthalsäure-Copolymer, Poly-4,4'-diphenylsulfonteterephthalamid, aus Terephthalsäure und Hexamethylen-tetramin, Terephthalsäure und Gemischen aus 2,2,4-Trimethylhexamethylen-diamin und, 2,4,4-Trimethylhexamethylen-diamin, aus Terephthalsäure, Diaminomethylen-norbornen und ϵ -Caprolactam, aus Isophthalsäure und Laurinlactam, aus Isophthalsäure und Di-4-(cylohexylamino-3-methyl)-methan, aus 1,12-Decandisäure und 4,4'-Diaminodicyclohexylmethan, aromatische Polyamide mit Heterocylen, aus Dicarbonsäuredichlorid, Terephthalsäure und Isophthalsäure, diaminhaltige Heterocylen, mit Oxidiazol, Triazol, Bithiazol, und Benziimidazol Strukturen 3-(p-Aminophenyl)-7-amino-2,4-(1H,3H)-chinazolin-4-on mit Isophthalsäure, Polyaminosäuren, Poly-methyl-L-glutamat, Poly-L-glutaminsäure u. a., Copolypeptide z. B. Glutaminsäure und Leucin, Glutaminsäure, und Phenylalanin, Glutaminsäure und Valin, Glutaminsäure und Alanin, Lysin und Leucin, p-Nitro-D,L-pheny-

lalanin und Leucin u. a., Polyharnstoffe aus Diisocyanaten mit Diaminen und Harnstoffen, Polyurethan aus aliphatischen und aromatischen Diisocyanaten und, bifunktionellen und trifunktionellen hydroxylhaltigen aliphatischen, Polyestern (siehe oben) und aliphatischen Polyethern (siehe oben) und, gegebenenfalls Modifizierung, mit bifunktionellen aminogruppenhaltigen, hydroxylgruppenhaltigen, und carboxylgruppenhaltigen Substanzen, z. B. Hexamethylen-diisocyanat, Diphenylmethandiisocyanat, Tolyendiisocyanat, 2,4 und 2,6-Tolidindiisocyanat, Xylylendiisocyanat, Glycerin, Ethylenglykol, Diethylenglykol, Pentaerithrit, 3-Dimethylamino-1,2-propandiol, und Kohlenhydrate, aliphatische und aromatische Dicarbonsäuren und deren Derivate, o,p,m-Phenylendiamin, Benzidin, Methylen-bis-o-chloroanilin, p,p'-Diaminodiphenylmethan, 1,2-Diaminopropan, Ethylendiamin, Aminoharze aus Harnstoff und cyclischen Harnstoffen, Melamin, Thioharnstoff, Guanidin, Urethan, Cyanamid, Säureamide und Formaldehyd sowie höhere Aldehyde und Ketone, Silikone, Polydialkylsiloxan, Diarylsiloxan und Alkyl-arylsiloxan wie, Dimethyl-, Diethyl-, Dipropyl-, Diphenyl-, Phenylmethyl-Siloxan, Silikone mit funktionellen Gruppen, z. B. Allylgruppen, γ -substituierte Fluorsilikone mit Aminogruppen und, Vinylgruppen z. B. Aminopropyltriethoxysiloxan, 2-Carboxylpropylmethylsiloxan, Blockpolymer mit Dimethylsiloxaneinheiten und Polystyrol oder, Polycarbonatblöcken, Dreiblockcopolymer aus Styrol, Butylacrylat mit, α,ω -Dihydroxy-Polydimethylsiloxan, 3,3,3-Trifluorpropylmethylsiloxan, Avocane (90% Polypropylen-glykol und 10% Siloxan, Blockcopolymer aus Silikon und Polycarbonat, Cellulose und Cellulose-derivate, z. B. Celluloseacetat, Perfluorbutyrylethylcellulose, Perfluoracetylcellulose, Perfluoracetylcellulose, Cellulosenitrat, Carboxymethylcellulose, regenerierte Cellulose, regenerierte Cellulose aus Viskose, und ähnliche Cellulose-derivate, Agarose, Polysaccharide wie Carragenane, Dextrane, Mannane, Fructosane, Chitin, Pectine, Glykosaminoglycane, Stärke, Glykogen, Algin-säuren, sowie alle Deoxypolysaccharide wie Halogen-de-oxypolysaccharide, Amino-deoxypolysaccharide oder Sulfhydryl-deoxypolysaccharide und deren Derivate, Murein, Proteine, z. B. Albumin, Gelatine, Kollagen I–XII, Keratin, Fibrin und Fibrinogen, Casein, Plasmaproteine, Milchproteine, Strukturproteine aus tierischen und pflanzlichen Geweben, Sojaproteine, Proteine aus der Nahrungsmittelindustrie.

Die erweiterte Auswahl von Polymeren ergibt sich dadurch, daß oben aufgeführte Polymere, die aus den verschiedenen Monomerbausteinen synthetisiert werden, mit weiteren bisher bekannten Monomeren copolymerisiert werden (es werden darunter die Monomeren verstanden, die in dem Buch Funktional Monomer, Ed. R. H. Yocum und E. B. Nyquist Vol. I und II; Marcel Dekker, New York 1974 aufgeführt sind). Des weiteren können die oben aufgeführten Polymeren durch Pfropfung, durch polymeranaloge Reaktionen und durch Herstellung von weiteren Blockcopolymeren und Pfropfcopolymeren partiell oder voll modifiziert werden. Außerdem können Polymermischungen, Legierungen, beschichtete Polymere und Polymere in Form verschiedener Verbundwerkstoffe hergestellt werden. Diese Polymere können Oberflächen-modifiziert werden durch energiereiche Strahlung, Belichtung, Oxidation, hydrolytischen Anbau, durch photochemische Reaktionen, durch Halogenierung, Sulfochlorierung, Chlormethylierung, durch Umsetzung mit Radikalbildnern, u. a.

Weiterhin können Polymerderivate mit bi- und poly-

funktionellen, Verbrückungsreagenzien hergestellt werden, wie sie zur Herstellung von reaktionsfähigen Polymeren nach den Methoden der Peptid-, Protein-, Polysaccharid- und Polymerchemie bekannt sind. Im folgenden ist eine Auswahl der zur Derivatisierung von Polymeren verwendbaren funktionellen Gruppen oder Vernetzungsmolekülen gegeben:

Phosgen, Formaldehyd, Glyoxal, Acrolein, Glutardialdehyd, Azide, aktivierte Ester, Anhydride, Säurechloride, Ester, gemischte Anhydride, Bromcyan, Difluordinitrobenzol, Thiisocyanat, Epoxid, Imid, Isocyanate, Urethiongruppen, Diisocyanate, Triisocyanate, Maleinimid, Dicyclohexylcarbodiimid NN'-Bis-(trimethylsilylschwefeldiimid), Peroxide, Vinylketongruppen, aromatische Diazoverbindungen, Vinylsulfon, Trichlortriazin, Monochlortriazin, Dichlortriazin, Bromacrylamid, Difluorchlorpyrimidin, Trichlorpyrimidin, Dichlorchinoxalin, Chloracetylaminogruppen, Chloracetylharnstoff, β -Halogenpropionamid, α,β -Dihalogenpropionamid, β -Quaternäres ammoniumpropionamid, β -Sulfatopropionamid, β -Sulfonylpropionamid, substituierte Alkan Dicarboxamide, substituierte Alkan Monocarboxylate, substituierte Cycloalkan-Carboxamide, Alken Monocarboxamide, Arylamide, Crotonamide, substituierte Acrylamide, Mono, Di- und Trihalogen Arylamide, substituierte Crotonamide, Alken-dicarboxamide, Cyclische Halogenmaleinimide, Alkin Carboxamide, substituierte aliphatische Ketone, Amide von substituierten aliphatischen Sulfonsäuren, substituierte Methansulfonamide, substituierte Ethansulfonamide, β -Sulfatoethylsulfonamide, β -Thiosulfatoethylsulfonamide, quaternäres Ammoniummethansulfonamid, Vinylsulfonamid, β -Chlorvinylsulfonamid, Ester von reaktiven aliphatischen Sulfonsäuren, β -substituierte Ethylsulfone, β -Thiosulfatoethylsulfone, β -Halogenvinylsulfon, β -substituierte Ethylamin-derivate, β -Sulfatoethylamin, β -Halogenethylpyrazolon, N-(β -Halogen-ethyl-amide, N-(β -Sulfatoethyl)-amide, β -substituierte Ethylammonium Verbindungen, β -substituierte Ethylamide von Sulfonsäuren N, β -Halogenethylsulfonamide, β -Dihalogenpropionylamide von Sulfonsäuren, β -Sulfatoethylamide von Sulfonsäuren, Ethylenimin und Ethyleniminverbindungen, Allylgruppen, Propargylgruppen, Diallylphthalat, Triallylcyanurat, Benzyl-derivate, 2-substituierte Thiazolcarbonsäuren, Chlorsulfonylpyridin, 4-substituiertes 3,5-dicyano-2,6-dichlorpyridin, 2,6-bis-(methylsulfonyl)-pyridin-4-carbonylchlorid, Chlorpyridazin, Dichlorpyridazon, 1-Alkyl-4,5-dichlor-6-pyridazon, Chlor- und Brompyrimidin, 3-(2',4',5'-trichlorpyrimidyl-(6')-amino)-anilin, 4,5,6-Trichlorpyrimidin-2-carbonylchlorid, Trifluorpyrimidin, Trifluorchlorpyrimidin, 2-Chlortriazinyl-derivate, 2-Chlor-4-alkyl-s-(triazinyl-6-aminocarbonsäure), 2-Chlorobenzothiazolcarbonyl, 6-Amino-2-fluorbenzothiazol, 2-Methylsulfonyl-6-aminobenzothiazol, 2,3-dichlorchinoxalin-6-carbonylchlorid, 1,4-Dichlorphthalazin-6-carbonylchlorid, 3-chloro-1,2,4-benzotriazin-1-N-oxid-7-carbonylchlorid, Fluor-2-nitro-4-azidobenzol, Sulfonsäureester, N-Sulfonylharnstoffe, Thiosulfato-S-Alkylester, N-Methylthylolharnstoff, N,N'-dimethylol-glyoxal-monourein, Terephthalaldehyd, Mesityl-trialdehyd, Isothiuroniumgruppen, Triacylformal.

Die oben aufgeführten synthetischen Polymere und Biopolymere sowie die daraus hergestellten Polymerderivate mit den oben aufgeführten Vernetzern bzw. funktionellen Gruppen von Vernetzern oder Verfahren zur Oberflächenmodifizierung von Polymeren können zur Verankerung von HSI erfindungsgemäß eingesetzt werden. Analog kann HSI mit den oben aufgeführten

Vernetzermolekülen bzw. den funktionellen Gruppen von Vernetzern und den Verfahren zur Oberflächenmodifizierung zur Modifizierung von HS I für die erfindungsgemäße Verankerung an Polymere eingesetzt werden. Die kovalente Verbrückung von HS I an polymere Substrate kann entweder mit der Querbrückenlänge "0" (Selbstquervernetzung oder Vernetzung nur unter Beteiligung der funktionellen Gruppen des polymeren Substrates und des HS I) oder mit der Querbrückenlänge größer 0 unter Verwendung von hydrophilen oder hydrophoben, amphiphilen, geladenen, ungeladenen, flexiblen oder sperrigen Spacern in einer Größenordnung 0,2–5 nm erfolgen.

Die Verankerung von HS I an Polymere oder Polymerderivate kann weiterhin erfolgen über

1. salzartige Bindung an positiv-geladene Gruppen von Polymeren, z. B. quarternäre Ammoniumgruppen und Phosphoniumgruppen,
2. Chelatbindung nach den bekannten Methoden zur Herstellung von Chelatbindungen mit funktionellen Gruppen von Makromolekülen und Metallen,
3. über hydrophobe Interaktionen durch Derivatisierung von HS I und/oder Polymeroberflächen mit gesättigten und/oder ungesättigten langkettigen Kohlenwasserstoffen mit einer Kettenlänge von 8–30 Methylengruppen, versehen mit den bekannten funktionellen Gruppen, oder mit cyclischen oder heterocyclischen, gesättigten oder ungesättigten Kohlenwasserstoffen mit einer Anzahl Kohlenstoffatome von 6–50.

Weiterhin kann die Verankerung von HS I erfolgen über Adsorption, Einschluß in polymere Netzwerke, Einkapselung oder physikalische Vermischung nach den Methoden der Kunststoffverarbeitung.

Für den erfindungsgemäßen Einsatz der hämokompatiblen Substrate in Form von Fasern, Hohlfasern, Membranen, Organersatzteilen, Kanülen, Spritzen, Schläuchen, Blutbehältern oder in anderer Form werden die verwendeten oder die hergestellten Polymeren nach ihren für den Verwendungszweck geeigneten physikalischen, mechanisch-technologischen und chemischen Eigenschaften ausgewählt.

Beispiele

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der vorliegenden Erfindung. Dabei wurde so vorgegangen, daß zunächst die Gewinnung von HS I zwecks erfindungsgemäßer Verankerung an polymere Substrate beschrieben wurde. Danach wurde an wenigen ausgewählten Beispielen die kovalente Verankerung an polymere Substrate dargestellt, wobei zum besseren Verständnis überwiegend eine Polymerklasse beschrieben wurde.

Beispiel 1

Gewinnung HS I aus kultivierten bovinen Aorta-Endothelzellen zur Verankerung an polymere Substrate.

Rinderaortae werden von frisch geschlachteten Tieren entnommen. Die Aortae werden von Fettgewebe etc. befreit und die Aa. intercostales mit Klemmen ligiert. Die Aortae werden dann mit 3 × 50 ml sterilem PBS gespült und an einem Ende mit einer Klemme ligiert. Eine sterile Lösung von 0,1% bovinem Pankreas

Trypsin (Boehringer Mannheim) in 1 mM EDTA/PBS wird von oben in die Aortae gefüllt und das zweite Ende ligiert. Die Aortae werden dann 7,5 min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert.

- 5 Eine der Aortae-Endligaturen wird entnommen und die Flüssigkeit wird mit einer sterilen Pipette entnommen. Die in der Lösung suspendierten Zellen werden bei 800 × g und 37°C 10 min abzentrifugiert, in sterilem Dulbecco's modified essential medium (DMEM) + 10% fetalem Rinderserum in Gegenwart von 10 000 U Penicillin und 10 000 U Streptomycin (Endothelzellmedium) bei 37°C aufgenommen.

- 15 Eine sterile 75 cm² Gewebekulturflasche wird mit 20 ml Endothelzellmedium 1 h bei 37°C inkubiert. Zu dieser Flasche werden die abzentrifugierten Zellen, suspendiert in 1 ml Endothelzellmedium, gegeben. Die Flasche wird dann in einem Inkubator bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und gesättigtem Wasserdampf zur Aufzucht der Zellen aufbewahrt.

- 20 Die Zellen werden morphologisch und durch Färbung mit anti-bovinem Faktor VIII a Antikörpern (Dianova, Hamburg) charakterisiert.

- Die Zellen werden zur Konfluenz gezüchtet, mit sterilem PBS gewaschen, von der Unterlage gelöst durch Inkubation mit 2 ml 0,1% Trypsin in 1 mM EDTA/PBS für 3 min bei 37°C mit 5 ml Endothelzellmedium versetzt, bei 800 × g abzentrifugiert, in 9 ml Endothelzellmedium resuspendiert und in jeweils 3 ml dieser Suspension in drei neue 75 cm² Gewebekulturflaschen ausgesät, wie oben beschrieben.

- 30 Zur Massenkultur werden die Zellen in Rollerflaschen ausgesät, in der gleichen Weise wie für die Anzüchtung in den 75 cm² Flaschen beschrieben. Etwa 10⁹ Zellen werden für eine HS I Präparation eingesetzt. Zur Vorbereitung für die HS I-Präparation werden die Zellen mit 1 mM EDTA in PBS von der Unterlage gelöst, durch 3mal 30 s Ultraschallbehandlung bei 0°C mit jeweils 1 min Unterbrechung zwischen jedem Ultraschall homogenisiert, bei 10 000 × g abzentrifugiert und der Überstand auf 2% SDS eingestellt. Diese Lösung (etwa 5 ml) wird auf eine Sepharose CL-6B Säule (5 × 100 cm) gegeben. Eluiert wird mit 0,1% SDS, 0,1 M Tris/HCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA pH 7,5. Fraktionen von 20 ml werden aufgefangen bei einer Flußgeschwindigkeit von 100 ml/h.

- 45 Der Ausschluß der Säulenchromatographie (Fraktion 35–50) wird in 80% Ethanol präzipitiert, bei 10 000 × g abzentrifugiert, im Wasserstrahlvakuum getrocknet und in 50 ml 7 M Harnstoff, 0,1% CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio)-1-propansulfonat), 0,1 M Tris/HCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA pH 7,3 gelöst (Lösungspuffer) und auf eine DEAE-Cellulose Säule (2,5 × 5 cm) gegeben. Die Säule wird mit 100 ml des Lösungspuffers äquilibriert und dann mit einem linearen Gradienten von 0–1 M NaCl auf der Basis des Lösungspuffers eluiert (250 + 250 ml). Die Fraktionen, die zwischen 0,45–0,6 M NaCl eluieren, werden gesammelt, in 80% Ethanol präzipitiert, bei 10 000 × g abzentrifugiert und im Vakuum getrocknet.

- 60 Die Substanz wird in 12,8 ml 0,1 M Tris/HCl, 4 M Guanidiniumhydrochlorid und Cäsiumchlorid der Dichte 1,4 g/ml gelöst und in einem SW 40 Rotor (Beckmann) bei 35 000 Upm 60 h zentrifugiert. Das Zentrifugationsröhrchen wird am Boden punktiert und Fraktionen von 1 ml werden gesammelt. Die Fraktionen mit einer Dichte größer 1,4 g/ml werden gesammelt, in 80% Ethanol präzipitiert, bei 10 000 × g abzentrifugiert und im Vakuum getrocknet.

Die Substanz wird in 2 ml 0,1 M Tris/HCl, 1 mM PMSE, 1 mM EDTA pH 7,5 gelöst und mit 1 U Chondroitinase ABC und 100 U RNase (Boehringer Mannheim) 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wird die Substanz wie oben beschrieben, an Sepharose CL-6B rechromatographiert. Die Ausbeute beträgt im Mittel etwa 14 mg/10⁹ Endothelzellen.

Beispiel 2

Gewinnung von HS I Polysaccharid aus konditioniertem humanen Umbilical-Endothelzellmedium.

Die Umbilicalvenen aus frischen humanen Nabelschnüren werden mit sterilem PBS gespült und dann mit einer sterilen Lösung von 10 000 U Kollagenase (Boehringer Mannheim) in Cord-Puffer 5 min bei 37°C perfundiert. Die Zellen werden bei 37°C und 800 × g 5 min abzentrifugiert.

Menschliche Seren werden aus dem menschlichen Blut durch Koagulation und Zentrifugation bei 2000 × g gewonnen. Die Seren dürfen in einem SMA-12 Profil keine pathologischen Auffälligkeiten zeigen.

Boviner Wachstumsfaktor wird aus 10 Rinderhypothalami von frisch geschlachteten Tieren durch Homogenisierung und Extraktion mit Aceton/Chloroform 2:1 gereinigt.

Der in dem Entfettungsmittel unlösliche Rückstand wird in Mengen von 15–50 mg/l Kulturmedium eingesetzt.

Menschliches Fibronectin wird aus menschlichem Plasma gewonnen. Dazu wird 10 g Gelatine (Sigma) in 50 ml 0,2 M NaAc bei 65°C gelöst. 200 ml Sepharose CL-2B wird mit 10 g Bromcyan bei einem pH von 10,5 10 min umgesetzt. Das Gel wird danach mit 10 l 0,2 M NaAc gewaschen und mit der Gelatine-Lösung zusammen bei 4°C 24 h geschüttelt. Anschließend wird nach Zugabe von 5 ml Aminoethanol 7 h weitergeschüttelt. Das Gel wird mit 4 M Guanidiniumchlorid und anschließend mit PBS gewaschen (je 1 l). 1 l menschliches Plasma wird mit dem Gel zusammen 24 h bei 4°C geschüttelt. Das Gel wird anschließend mit 5 l PBS auf der Fritte gewaschen und mit 200 ml 1 M NaCl eluiert. Das Eluat wird gegen 3 × 5 l PBS dialysiert und durch Filtration über einen 0,2 µm Filter sterilisiert.

Die humanen Endothelzellen werden in 20 ml DMEM + 10% menschlichem Serum in Gegenwart von 10 000 U Penicillin, 10 000 U Streptomycin und Wachstumsfaktor suspendiert. Eine 75 cm² Gewebekulturflasche wird mit 2 ml der Fibronectinlösung bei Raumtemperatur 3 h inkubiert. Die Lösung wird entfernt, die Flasche mit PBS gewaschen und die Zellen hinzugegeben. Die Flasche wird in einem Inkubationsschrank zur Aufzucht der Zellen gegeben (siehe oben).

Die Passagierung und die Massenkultivierung in Rollerflaschen erfolgt mit den gleichen Medien und Kulturgefäßpräparationen, sowie Zellkulturtechniken, wie beschrieben.

Die gesammelten konditierten Medien (etwa 25 l) werden mit 10 M NaOH auf 0,5 M NaOH eingestellt und 12 h bei 4°C inkubiert. Das Medium wird anschließend mit 10 M HCl auf pH 1,5 bei 4°C eingestellt und bei 10 000 × g abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 10 M NaOH neutralisiert und an Amicon PM 10 Membranen ultrafiltriert bis zu einem Volumen von 100 ml. Die Lösung wird auf 80% Ethanol eingestellt, 12 h bei 4°C stehengelassen und bei 10 000 × g abzentrifugiert. Der Niederschlag wird in PBS aufgenommen, 1 h mit

10 U Chondroitinase ABC bei 56°C inkubiert und auf eine Dowex 1 × 2 Säule (20 ml Gel) gegeben. Die Säule wird mit je 20 ml 1 M NaCl und 4 M NaCl gewaschen. Das 4 M NaCl Eluat wird gegen 3 × 1 l Wasser dialysiert und lyophilisiert. Die Ausbeute beträgt etwa 1,2 mg.

Beispiel 3

Kupplung von HS I an Silikon

1 g Silikon mit freien OH-Gruppen wird mit 18 ml dest. Wasser und 2 ml g-aminopropyltriethoxysilan (10% v/v) versetzt und der pH-Wert mit 6 N HCl zwischen pH 3 und pH 4 eingestellt. Nach pH Einstellung wird aus 75°C 2 h erhitzt, gewaschen und getrocknet. 1 g Aminogruppenhaltiges Silikon wird mit 2,5% wäßriger Lösung von Glutardialdehyd in 0,05 M NaPhosphat Puffer versetzt und auf pH 7,0 eingestellt, Reaktionsdauer 60 min. Das aktivierte Silikon wird mit einer 1%igen Lösung von HS I unter Rühren 2–4 Stunden umgesetzt. Es wird mit 6 M Harnstofflösung gewaschen.

Beispiel 4

Isothiocyanat Kupplungsreaktion von HS I an Silikon

1 g Aminogruppenhaltiges Silikon wird mit einer 10%igen Lösung von Thiophosgen in Chloroform (V/V) umgesetzt. Die Reaktionsmischung wird mindestens 4 h am Rückfluß gehalten, besser jedoch 12–15 h. Es wird mit trockenem Chloroform gewaschen und vakuumgetrocknet. Zum Isothiocyanat-Silikon wird langsam eine wäßrige 1% HS I-Lösung (50–100 mg HS I/g Silikon) gegeben. Der pH-Wert wird auf 8,5 eingestellt und es wird 2 h umgesetzt vor der Wäsche mit einer 6 M Harnstofflösung.

Beispiel 5

Carbodiimid Kupplung von HS I an Aminogruppenhaltiges Silikon

Zu 1 g Aminogruppenhaltigem Silikon werden 50 ml 0,03 M Phosphorsäure mit einem pH-Wert von 4,0 gegeben. Danach werden 100–200 mg wasserlösliches Carbodiimid und 50–100 mg HS I zur Mischung gegeben und 24 h reagieren gelassen. Es wird wie oben beschrieben gewaschen.

Beispiel 6

Triazin Kupplung von HS I an Aminogruppenhaltiges Silikon

Zu 1 g Aminogruppenhaltigem Silikon werden 10 ml Benzol gegeben, das 0,2 ml Triethylamin und 0,3 g 1,3-Dichlor-5-methoxytriazin enthält. Die Reaktionsmischung wird 2–4 h bei 45–55°C gehalten, abdekantiert, mit Benzol gewaschen und getrocknet. Die Kupplung mit HS I (50–100 mg) erfolgt in 0,05 M Phosphat Puffer bei pH 8 bei 4°C über Nacht. Es wird wie oben beschrieben gewaschen.

Beispiel 7

Immobilisierung von HS I über Glutardialdehyd

0,1–10 ml verdünnte Glutardialdehydlösungen

(0,1—5%) wird zu 1 g dispergierten oder imprägnierten Aminogruppen-haltigem Polymer und 10 mg HS I gegeben und bei pH 7,4 0,5—2 min umgesetzt. Danach wird er sofort mit kaltem Wasser gewaschen. oder copolymerisiert.

Beispiel 8

Thermische und photochemische Immobilisierung von HS I an Polymere

1 g Fluor-2-nitro-azidobenzol wird mit 10 g HS I im Dunkeln bei 50°C und maximal pH 10,5 in 0,05 M Natriumborat-Puffer 16—64 h umgesetzt. Das Reaktionsprodukt wird abfiltriert und mit 95% Ethanol gewaschen. Die Photoimmobilisierung am Polymere erfolgt in einigen Stunden bei 200—300 Watt mit einer Quecksilberdampflampe. Danach wird wie oben beschrieben gewaschen.

Beispiel 9

Verankerung von HS I über Oxirangruppen an Hydroxyl- und Aminogruppen-haltige Polymere

10 g gewaschenes 2%iges Agarose-Gel wird suspendiert in 5 ml 2,5 M NaOH-Lösung. 20 mg Natriumborhydrid wird zugefügt und danach werden tropfenweise 1,4-Butandiolglycidylether unter heftigem Rühren zugegeben. Die Reaktion dauert 6 h bei Raumtemperatur. Dann wird 50 ml Aceton zugegeben und schließlich Wasser. Das Oxirangel wird suspendiert in 25 ml 0,5 M Natriumbicarbonat und 50 mg HS I wird zugefügt. Die Reaktion dauert 5 h. Das Produkt wird wie oben beschrieben gewaschen.

Beispiel 10

Azokupplung von HS I über Arylamingruppen an Polymere

1 g Aminogruppen-haltiges Silikon wird in 25—50 ml Chloroform gelöst, das 5% Triethylamin (V/V) und 1 g p-Nitrobenzoylchlorid enthält. Die Reaktionsmischung wird wenigstens 4 h unter Rückfluß gehalten. Es wird gewaschen mit trockenem Chloroform und gekocht unter Rückfluß in einer 5% Natriumthionitlösung. Die Azokupplung erfolgt mit 1 g Arylamin-Silikon durch Zugabe von 20 ml 2 N HCl im Eisbad. Es wird 100 mg festes Natriumnitrit zugegeben und 30 min diazotiert. Danach wird gewaschen mit Eiswasser. 100 mg HS I werden bei pH 8,5 in 0,05 M Natriumphosphat gelöst und 1 g diazotiertes Polymer zugegeben. Es wird zwischen 2—18 h gekuppelt. Das Produkt wird wie oben beschrieben gewaschen.

Beispiel 11

Herstellung von Polymer-gebundenen HS I durch Copolymerisation mit Alkylierungs- und Acylierungsmonomeren

3,4-Epoxybuten, Acrylsäure-2-3-epoxypropylester, Acrylsäure-2-3-thioglycidylester, 1-Allyloxy-3-(N-ethylenimin)-2-propanol, Acrylsäure-0-succinimidester oder Acrylsäurechlorid, Maleinsäureanhydrid, Chlormaleinsäureanhydrid, Maleinsäureazid oder 3-Bromopropen werden in equimolaren Mengen mit HS I umgesetzt und anschließend mit den üblichen Methoden polymerisiert

- Leerseite -